

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APPLICANT: YEON-SU LEE, ET AL.)
)
FOR: VARIANT OF HNF-1 α GENE HAVING NEW)
SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM AND)
VARIANT OF PROTEIN ENCODED BY THE)
SAME)

CLAIM FOR PRIORITY

Mail Stop Patent Application
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

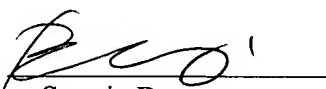
Dear Commissioner:

Enclosed herewith is a certified copy of Korean Patent Application No. 2002-0056229 filed on September 16, 2002. The enclosed Application is directed to the invention disclosed and claimed in the above-identified application.

Applicant hereby claims the benefit of the filing date of September 16, 2002, of the Korean Patent Application No. 2002-0056229, under provisions of 35 U.S.C. 119 and the International Convention for the protection of Industrial Property.

Respectfully submitted,

CANTOR COLBURN LLP

By: 
Soonja Bae
Registration No. (Please see attached)
Cantor Colburn LLP
55 Griffin Road South
Bloomfield, CT 06002
Telephone: (860) 286-2929
PTO Customer No. 23413

Date: September 15, 2003

**KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE**

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Industrial Property Office.

Application Number: Patent Application No. 2002-56229

Date of Application: 16 September 2002

Applicant(s): Samsung Electronics Co., Ltd.

27 November 2002

COMMISSIONER

대한민국특허청
KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0056229
Application Number PATENT-2002-0056229

출원년월일 : 2002년 09월 16일
Date of Application SEP 16, 2002

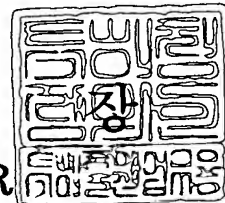
출원인 : 삼성전자 주식회사
Applicant(s) SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD. 50



2002 년 11 월 27 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0001
【제출일자】	2002.09.16
【국제특허분류】	C12N
【발명의 명칭】	새로운 단일염기다형성을 포함하는 HNF-1a 유전자 변이체 및 그 단백질 변이체
【발명의 영문명칭】	A variant of HNF-1a gene having novel single nucleotide polymorphism and a variant protein encoded by the same
【출원인】	
【명칭】	삼성전자 주식회사
【출원인코드】	1-1998-104271-3
【대리인】	
【성명】	이영필
【대리인코드】	9-1998-000334-6
【포괄위임등록번호】	1999-009556-9
【대리인】	
【성명】	이해영
【대리인코드】	9-1999-000227-4
【포괄위임등록번호】	2000-002816-9
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이연수
【성명의 영문표기】	LEE, Yeon Su
【주민등록번호】	640615-2023814
【우편번호】	411-410
【주소】	경기도 고양시 일산구 대화동 성저마을13단지아파트 건영빌라 1307-1 01
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정성영
【성명의 영문표기】	JUNG, Seong Young
【주민등록번호】	740222-1469410

【우편번호】	340-864
【주소】	충청남도 예산군 신암면 종례리 86번지
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	안규정
【성명의 영문표기】	AHN,Kyu Jeung
【주민등록번호】	630111-1009414
【우편번호】	135-947
【주소】	서울특별시 강남구 일원본동 가람아파트 108동 401호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김병준
【성명의 영문표기】	KIM,Byung Joon
【주민등록번호】	641007-1006520
【우편번호】	139-223
【주소】	서울특별시 노원구 중계3동 건영아파트 101동 906호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김숙영
【성명의 영문표기】	KIM,Sook Young
【주민등록번호】	730214-2406417
【우편번호】	449-901
【주소】	경기도 용인시 기흥읍 농서리 산 14번지 기숙사 C동(여) 505호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김미경
【성명의 영문표기】	KIM,Mi Kyung
【주민등록번호】	630205-2055211
【우편번호】	305-390
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 청구나래아파트 109동 1505호
【국적】	KR

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】**【서열개수】** 23**【서열목록의 전자파일】** 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
필 (인) 대리인
이해영 (인)

【수수료】**【기본출원료】** 20 면 29,000 원**【가산출원료】** 9 면 9,000 원**【우선권주장료】** 0 건 0 원**【심사청구료】** 0 항 0 원**【합계】** 38,000 원**【첨부서류】** 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 인간 HNF-1 α 유전자의 새로운 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 핵산 단편에 관한 것으로, 구체적으로는 서열번호 1의 1699번 염기 A의 다형성 부위 또는 서열번호3의 29번 염기 T를 포함하고, 서열번호 1 또는 3의 서열에 개시된 10개 이상의 연속적 뉴클레오티드 또는 상기 뉴클레오티드의 상보체를 포함하는 것을 특징으로 한다.

【대표도】

도 1

【색인어】단일염기다형성, HNF-1 α , 당뇨병, MODY3

【명세서】

【발명의 명칭】

새로운 단일염기다형성을 포함하는 HNF-1 α 유전자 변이체 및 그 단백질 변이체{A variant of HNF-1 α gene having novel single nucleotide polymorphism and a variant protein encoded by the same}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 HNF-1 α 의 돌연변이 염기가 포함된 부분을 포함하는 게놈 DNA 부분을 나타내는 도면이다.

도 2는 본 발명의 HNF-1 α 의 돌연변이 염기가 포함된 인트론8을 포함하는 게놈 DNA 부분을 나타내는 도면이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<3> 본 발명은 서열번호 1의 1699번 염기가 A인 다형성 부위 또는 서열번호3의 29번 염기가 T인 다형성 부위를 포함하고, 서열번호 1 또는 3의 서열에 개시된 10개 이상의 연속적 뉴클레오티드를 포함하는 핵산 단편 또는 그의 상보체에 관한 것이다.

<4> 종래 특정 유전자의 변형이 어떤 질병을 유발할 가능성이 높은 경우, 그 유전자의 변형에 따른 질병의 발생 여부 및 발생 가능성을 진단하기 위하여 PCR을 통하여 유전자의 증폭, 염기서열분석, 혼성화, 단일가닥구조다형성(SSCP: single strand conformational polymorphism) 등을 통해서 유전자 변이(돌연변이 또는 다형성)를 알아

보는 방법이 의료계에서 유전자 변이 분석의 방법으로 널리 쓰이고 있었다. 예를 들어, 유방암을 발병시키는 것으로 알려진 BRCA 유전자에 대한 유전자 검사는 PCR 및 염기서열 분석방법으로 상업적으로 이루어지고 있다.

<5> MODY3 유전자는 제2형 당뇨병 중의 한 부분인 MODY (maturity onset diabetes of the young) 질병을 유발시키는 유전자 중의 하나이다. MODY3 유전자는 제2형 당뇨병의 10~30% 또는 그 이상에서 원인일 것으로 여겨지고 있다(Matschinsky & Magnuson, in "Molecular Pathogenesis of MODYs", Karger, 1998; Yamada 등, "Identification of mutations in the HNF-1a gene in Japanese subjects with early onset NIDDM and functional analysis of the mutant proteins", *Diabetes* 48:645, 1997; Yoshiuchi 등, "Analysis of a non-functional HNF-1a (TCF1) mutation in Japanese subjects with familial type 1 diabetes", *Human mutation* 18:345, 2001; 미국특허 제6,187,533호; WO9811254).

<6> 그러나, 현재까지 한국인에서 보고된 MODY3 유전자 돌연변이는 한 두 건(김경아 외 10인, 한국인 젊은 성인에서 발병한 제2형 당뇨병에서 Hepatocyte nuclear factor-1a 유전자 변이에 대한 연구, 당뇨병 학회지, 23:793, 1999년)에 지나지 않으며, 이들 중 이전에 보고되지 않은 새로운 돌연변이에 대한 보고는 없었다.

<7> 따라서, 이전에 보고되지 않은 새로운 돌연변이에 대한 요구가, 질병의 진단 및 발병 기작의 연구 및 치료약의 개발 등의 분야에서 요구되고 있다. 특히, 한국인의 인종적 지리적 고유성을 감안할 때, 한국인 MODY 환자들에서 고유한 MODY3 유전자 돌연변이들이 분포할 것으로 예상되며, 이들 돌연변이를 스크리닝할 필요성이 요구되고 있었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <8> 본 발명의 목적은 상기 새로운 돌연변이를 부위를 포함하는 10개 이상의 연속적 뉴클레오티드 및 그 상보체를 제공하는 것이다.
- <9> 또한, 본 발명의 목적은 상기 새로운 돌연변이 부위를 포함하는 핵산의 전부 또는 일부와 혼성화하는 대립형질 특이적 올리고뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- <10> 또한, 본 발명의 목적은 상기 새로운 돌연변이 부위를 포함하는 핵산의 염기서열을 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산의 분석방법을 제공하는 것이다.
- <11> 또한, 본 발명의 목적은 상기 핵산 돌연변이에 해당하는 아미노산 돌연변이가 포함된 아미노산 서열로서, 3개 이상의 연속적 아미노산을 포함하는 인간 HNF-1 α 폴리펩티드 변이체 또는 그 단편을 제공하는 것이다.
- <12> 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 핵산 돌연변이에 해당하는 아미노산 돌연변이를 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질의 분석방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <13> 본 발명의 핵산 단편은 서열번호 1의 1699번 염기 A의 다형성 부위(polymorphic site) 또는 서열번호 3의 29번 염기 T의 다형성 부위를 포함하고, 서열번호 1 또는 3의 서열에 개시된 10개 이상의 연속적 뉴클레오티드 또는 상기 뉴클레오티드의 상보체를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <14> 상기 핵산 단편은 서열번호 1의 1699번 염기 A의 다형성 부위를 포함하고, 서열번호 1의 서열에 개시된 10개 이상의 연속적 뉴클레오티드를 포함하는 것이면 어느 것이나 포함되며, HNF-1 α 유전자 그 자체도 포함된다. 바람직하기로는, 상기 서열번호 1의 서

열에 개시된 10개 이상이고 100개 이하의 연속적 뉴클레오티드 또는 그 상보체이고, 더욱 바람직하기로는 10개 이상이고 50개 이하의 것이고, 가장 바람직하기로는 10개 이상이고 20개 이하의 것이다. 상기 다형성 부위는 이들 단편의 어느 부위에나 위치할 수 있다. 이와 같은, 상기 핵산 단편의 구체적인 서열은, 예를 들면 표1과 같은 서열이 포함된다.

<15> 표1. 본 발명의 핵산 단편의 염기 서열의 예

길이(bp)	서열
10	c cac <u>a</u> tc ccc
	c ctc cac <u>a</u> tc
	ac <u>a</u> tc ccc ag
15	ctc cac <u>a</u> tc ccc agc
	acc acc ctc cac <u>a</u> tc
	<u>a</u> tc ccc agc cag gac
20	acc ctc cac <u>a</u> tc ccc agc ca
	ag gcc acc acc ctc cac <u>a</u> tc
	<u>a</u> tc ccc agc cag gac cct gc
25	acc acc ctc cac <u>a</u> tc ccc agc cag g
	a tct cag gcc acc acc ctc cac <u>a</u> tc
	<u>a</u> tc ccc agc cag gac cct gcc ggc a
30	gcc acc acc ctc cac <u>a</u> tc ccc agc cag gac
	gca tct cag gcc acc acc ctc cac <u>a</u> tc ccc
	cac <u>a</u> tc ccc agc cag gac cct gcc ggc atc
50	gca tct cag gcc acc acc ctc cac <u>a</u> tc ccc agc cag gac cct gcc ggc at
100	tcc agt gag tcc ggg ctt cac acg ccg gca tct cag gcc acc acc ctc cac

<17> a : 다형성 부위의 염기를 나타낸다.

<18> 또한, 상기 핵산 단편은 서열번호 3의 개시된 10개 이상의 연속적 뉴클레오티드를 포함하는 것이면, 어느 것이나 포함된다. 상기 서열번호 3은 인간 HNF-1 α 의 엑소 8과 9 사이에 위치하는 인트론 8의 서열이다.

<19> 또한, 상기 핵산은 DNA, RNA 또는 PNA일 수 있으며, 단일가닥 또는 이중가닥의 형태일 수도 있다. 이러한 핵산 단편은 천연 또는 합성된 것일 수 있다.

- <20> 본 발명에서 "다형(polymorphism)"이란 유전학적으로 결정된 집단내에서 2이상의 대체적 서열 또는 대립형질의 발생을 의미한다. 다형 마커 또는 부위는 발산이 일어나는 위치(locus)이다. 바람직한 마커는 선택된 집단에서 1% 이상, 더욱 바람직하기로는 10% 또는 20% 이상의 발생 빈도를 나타내는 두개 이상의 대립형질을 가진다. 다형성 부위는 단일 염기쌍일 수도 있다.
- <21> 또한, 본 발명의 대립형질 특이적 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1의 1699번 염기가 A인 다형성 부위 또는 서열번호 3의 29번 염기가 T인 다형성 부위를 포함하고, 서열번호 1 또는 3의 서열 또는 그 상보체와 혼성화하는 것을 특징으로 한다. 본 발명에서 "대립형질 특이적(allele-specific)"이란 각 대립형질에 특이적으로 혼성화하는 것을 의미한다. 예를 들면, 상기 서열번호 1의 1699번 염기가 A인 단일염기 다형(SNP)을 구별할 수 있도록 혼성화하는 것을 말한다. 여기서 혼성화란 엄격한 조건, 예를 들면 1M 이상의 염 농도 및 적어도 15℃ 이상의 온도하에서 보통 수행된다. 예를 들면, 5xSSPE(750mM NaCl, 50mM Na Phosphate, 5mM EDTA, pH 7.4) 및 25~30℃의 조건이 대립형질 특이적 프로브 혼성화에 적합할 수 있다.
- <22> 본 발명에 있어서, 상기 대립형질 특이적 올리고뉴클레오티드는 프로브일 수 있다. 본 발명에서 "프로브"란 혼성화 프로브를 의미하는 것으로, 핵산의 상보성 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 이러한 프로브에는 Nielsen 등, *Science* 254, 1497-1500(1991)에 기재된 펩티드 핵산을 포함한다. 본 발명의 프로브는 대립형질 특이적 프로브로서, 같은 종의 두 구성원으로부터 유래한 핵산 단편 중에 다형성 부위가 존재하여, 한 구성원으로부터 유래한 DNA 단편에는 혼성화하나, 다른 구성원으로부터 유래한 단편에는 혼성화하지 않는다. 이 경우 혼성화 조건은 대립형질간의

혼성화 강도에 있어서 유의한 차이를 보여, 대립형질 중 하나에만 혼성화하도록 충분히 엄격해야 한다. 이러한 본 발명의 프로브는 중앙부위(즉, 15 뉴클레오티드로된 프로브이면 7번 위치가, 16뉴클레오티드로된 프로브이면 8 또는 9번 위치)가 상기 서열의 다형성 부위와 정렬하는 것이 바람직하다. 이렇게 함으로써 다른 대립형질성 형태간에 좋은 혼성화 차이를 유발할 수 있다. 본 발명의 상기 프로브는 대립형질을 검출하기 위한 진단 방법 등에 사용될 수 있다. 상기 진단 방법에는 서던 블롯트 등과 같은 핵산의 혼성화에 근거한 검출방법들이 포함되며, DNA 칩을 이용한 방법에서 DNA 칩의 기판에 미리 결합된 형태로 제공될 수도 있다.

<23> 본 발명에 있어서, 상기 대립형질 특이적 올리고뉴클레오티드는 프라이머일 수 있다. 본 발명에서 "프라이머"란 적절한 버퍼 및 온도에서 적당한 조건(즉, 4종류의 뉴클레오티드 트리포스페이트, DNA 또는 RNA 폴리머라제 또는 역전사효소와 같은 중합제의 존재)하에서 주형으로부터 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드를 나타낸다. 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 통상 15 내지 30 뉴클레오티드이다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과 안정한 혼성체를 형성하기 위해서는 더 낮은 온도를 필요로 한다. 프라이머 서열은 주형과 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 주형과 혼성화할 정도로 충분히 상보적이어야 한다. 상기 프라이머는 그 3' 말단이 서열번호 1의 1699번 염기가 A인 다형성 부위 또는 서열번호 3의 29번 염기가 T인 다형성 부위와 정렬하는 것이 바람직하다. 상기 프라이머는 다형성 부위를 포함하는 표적 DNA에 혼성화하고, 상기 프라이머가 완전한 상동성을 보이는 대립형질 형태의 증폭을 개시한다. 이 프라이머는 반대편에 혼성화하는 제2 프라이머

와 쌍을 이루어 사용된다. 증폭에 의하여 두개의 프라이머로부터 산물이 증폭되고, 이는 특정 대립형질 형태가 존재한다는 것을 의미한다.

<24> 본 발명의 핵산의 분석방법은 서열번호 1의 1699번 다형성 부위 또는 서열번호 3의 29번 다형성 부위를 차지하는 염기를 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다. 이러한 방법은 먼저 피검체로부터 게놈 DNA 또는 RNA와 같은 핵산을 분리하는 단계 및 이 분리된 상기 핵산의 서열을 결정하고, 서열번호 1의 1699번 다형성 부위 또는 서열번호 3의 29번 다형성 부위의 염기를 결정하는 단계를 포함하여 이루어질 수 있다. 분석 결과, 상기 서열번호 1의 다형성 부위의 서열이 G 이외의 다른 염기이거나 상기 서열번호 3의 다형성 부위의 서열이 C 이외의 다른 염기이면, MODY일 가능성이 많은 것으로 판단할 수 있다. 여기에서 염기서열의 결정은 통상적으로 사용되는 방법, 예를 들면, 디디옥시법(dideoxy method)(Sambrook 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual(2판, CSHP, 뉴욕 1989)) 등이 사용될 수 있으며, 자동화된 기기를 사용할 수도 있다.

<25> 본 발명의 인간 HNF-1 α 폴리펩티드 변이체 또는 그 단편은 서열번호 2의 567번 아미노산이 발린 이외의 다른 아미노산, 바람직하기로는 이소루이신인 아미노산 다형성 부위를 포함하고, 서열번호2의 아미노산 서열로부터 유래하는 10개 이상의 연속적 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 한다. 서열번호2에 나타낸 바와 같이, 상기 인간 HNF-1 α 폴리펩티드 변이체 또는 그 단편은 567번 위치에 발린(Val) 대신에 이소루신(Ile)으로 구성되는 서열번호2의 아미노산 서열로부터 유래한 것이 바람직하다.

<26> 본 발명의 단백질의 분석방법은 서열번호 2의 567번 아미노산을 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 아미노산 서열을 결정하는 방법은 통상적으로 사용

되는 방법 즉, 화학적인 N 말단 또는 C 말단 염기서열 결정 방법 또는 MS/MS, MALDI-TOF와 같은 기기를 사용하여 행할 수 있다.

<27> 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<28> 실시예

<29> 본 실시예에서는 임상학적으로 MODY 질병인 것으로 추정되는 환자 97명으로부터 혈액 시료를 채취하여, 게놈 DNA를 분리한 후, 10개의 MODY3 유전자 엑손 및 인트론 부위를 증폭하여 염기서열분석을 실시함으로써 MODY3 유전자의 변이를 검출하였다.

<30> 실시예1 : 인간 HNF-1 α 유전자의 10개 엑손 DNA의 증폭

<31> 97명의 각 환자로부터 혈액을 채취하고, 이로부터 QIAGEN 혈액 미디 키트(QIAGEN; 독일)를 사용하여 게놈 DNA를 분리한 후, 10개의 MODY3 엑손은 PCR 반응 용액(표2)을 이용하여 증폭하였다. PCR 증폭 조건은 초기변성 5분(95℃)과 최종 연장(final extension)은 3분(72℃)이고, 변성 30초(95℃)/어닐링 15초(62℃)/연장 30초(72℃) 30회이었으며, 사용한 프라이머는 각각 다음 표3과 같다.

<32> 하기 표3의 프라이머에서 정방향 프라이머 (forward primer)에는 T7 프로모터 서열(taatacgactcactataggg)을, 역방향 프라이머 (reverse primer)에는 T3 프로모터 서열 (gtaaccctcactaaaggga)을 5' 말단에 첨가시킨 것이었다(참조: 대한민국 특허출원 제2001-80909호) .

<33> 표2. PCR 반응 용액의 조성

<34>	성분	부피($\mu\ell$)
	DNAse, RNAse-free water	12.8
	dNTP mix(2.5mM 각 뉴클레오티드)	2
	10x Taq polymerase 버퍼	2
	프라이머 세트(각 프라이머 10pmol)	2
	게놈 DNA(100~1.0 μg)	1
	Taq polymerase(5유니트/ $\mu\ell$)	0.2

<35> 표3. MODY3 유전자의 증폭에 사용된 PCR 프라이머

<36>	이름	서열
	Mody 3 promter sense(T7)	taatacgact cactataggg tggccgtgag catcctctgc c(서열번호 4)
	Mody 3 promter antisense(T3)	gtaaccctca ctaaaggagac gtgggttgcg tttgcctgc(서열번호 5)
	Mody 3 exon1 sense(T7)	taatacgact cactataggg cgtggccctg tggcagccga(서열번호 6)
	Mody 3 exon1 antisense(T3)	gtaaccctca ctaaaggag ggctcgttag gagctgaggg(서열번호 7)
	Mody 3 exon2 sense(T7)	taatacgact cactataggg cccttgctga gcagatcccg tc(서열번호 8)
	Mody 3 exon2 antisense(T3)	gtaaccctca ctaaaggag ggatggtgaa gcttcagcc(서열번호 9)
	Mody 3 exon3 sense(T7)	taatacgact cactataggg gcaaggtcag gggaatggac
	Mody 3 exon3 antisense(T3)	gtaaccctca ctaaaggag gccgttgtac ctattgcact cc
	Mody 3 exon4 sense(T7)	taatacgact cactataggg ggctcatggg tggctatttc tgc
	Mody 3 exon4 antisense(T3)	gtaaccctca ctaaaggag gtgtcccttg tccccacata cc
	Mody 3 exon5 sense(T7)	taatacgact cactataggg tgctgaggca ggacactgct tc
	Mody 3 exon5 antisense(T3)	gtaaccctca ctaaaggag acaagcaagg acactcacca gc
	Mody 3 exon6 sense(T7)	taatacgact cactataggg cccggacaca gcttggcttc c
	Mody 3 exon6 antisense(T3)	gtaaccctca ctaaaggag tccccaccag ctaccgatg ac
	Mody 3 exon7 sense(T7)	taatacgact cactataggg caggcctggc ctccacgcag
	Mody 3 exon7 antisense(T3)	gtaaccctca ctaaaggag gggctctgca gctgagccat
	Mody 3 exon8 & 9 sense(T7)	taatacgact cactataggg ggcccagtac acccacacgg g
	Mody 3 exon8 & 9 antisense(T3)	gtaaccctca ctaaaggag ggcagggaca gtaagggagg
	Mody 3 exon10 sense(T7)	taatacgact cactataggg gccttgcttg cctctgcagt g
	Mody 3 exon10 antisense(T3)	gtaaccctca ctaaaggag gccatctggg tggagatgaa g

<37> 증폭된 각각의 산물을 QIAquick 키트를 사용하여 정제하였다. 이렇게 정제된 각 산물들은 염기서열분석용 반응의 주형으로 사용하였다.

<38> 실시예2 : MODY3 유전자의 염기서열 분석 반응

<39> 정제된 10개의 MODY3 엑손에 대한 각각의 프라이머를 사용하여, ABI PRISM BigDye terminator cycle sequencing ready reaction 키트(Applied Biosystem, 미국) 방법으로 염기서열분석 PCR을 수행한 후, 얻어진 산물을 알콜 침전시켰다. 알콜 침전 후 포름아미

드에 현탁시켜 95℃에서 5분 동안 끓인 다음 4℃ 얼음에 곧바로 담근 다음, ABI PRISM 3700 Genetic Analyzer(Applied Biosystem, 미국)로 서열분석을 수행하였다.

<40> 실시예3 : MODY3 유전자의 변이 검출을 위한 분석

<41> 서열분석 결과 얻어진 DNA 서열을, NCBI의 데이터베이스에 있는 염기서열과 비교하여, DNASTar 프로그램(DNASTAR, Inc, 미국)을 이용하여 유전자 변이를 분석하였다.

<42> 그 결과, 일반적인 제2형 당뇨병 환자로 판명된 97명의 환자로부터 채취된 혈액으로부터 분리한 DNA로부터 유래한 MODY3 유전자의 각 10개의 엑손 서열 중, 4명의 환자에게는 돌연변이가 발견되었고, 그 중 1명의 환자에서 새로운 돌연변이가 발견되었다. 즉, 이 환자로부터 유래한 MODY3 유전자의 9번엑손의 1699번 염기 G가 A로 변이된 것이 발견되었다(도1). 또한, MODY3 유전자에 의하여 코드되는 아미노산 서열의 567번 발린(Val)을 이소루이신(Ile)로 변이시킴을 추정할 수 있었다(서열번호 2).

<43> 실시예4 : MODY3 유전자의 인트론 부분의 염기서열분석

<44> 실시예1 내지 3에 나타난 방법을 사용하여, HNF-1 α 의 인트론 부분의 염기서열을 분석하였다. 분석 결과, 1명의 환자로부터 새로운 돌연변이가 발견되었다. HNF-1 α 의 엑손 8과 9사이에 위치하는 인트론 8의 29번 염기 C가 T로 변이된 것을 발견하였다(도2).

<45> 이렇게 당뇨병 환자 중 MODY 환자 분포가 한국인에서 희박하게 나타나는 것은 MODY가 당뇨병 환자의 10%를 차지하는 유럽인종과는 다른 분포를 나타내는 것으로 추측된다. MODY 환자의 분포에 대한 더 자세한 연구가 이루어져야 한다.

【발명의 효과】

- <46> 본 발명의 핵산 단편에 의하면, MODY 질병의 진단 방법에 효율적으로 이용될 수 있다.
- <47> 본 발명의 대립형질 특이적 올리고뉴클레오타이드에 의하면, MODY 질병의 진단 방법 등에 프로브 또는 프라이머로서 이용될 수 있다.
- <48> 본 발명의 인간 HNF-1 α 폴리펩티드 변이체 또는 그 단편에 의하면, MODY 질병의 진단 방법에 효율적으로 이용될 수 있다.
- <49> 또한, 본 발명의 단백질의 분석방법에 의하면, 펩티드 서열 분석을 통하여 MODY 질병의 진단 방법에 효율적으로 이용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

서열번호 1의 1699번 염기 A의 다형성 부위 또는 서열번호 3의 29번 염기 T의 다형성 부위를 포함하고, 서열번호 1 또는 3의 서열로부터 유래하는 10개 이상의 연속적 뉴클레오티드를 포함하는 핵산 단편 또는 그의 상보체.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 서열번호 1의 1699번 염기가 C 또는 T이고, 서열번호 3의 29번 염기가 A 또는 G인 것을 특징으로 하는 핵산 단편 또는 그의 상보체.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 단편은 10 내지 100 개 이상의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 핵산 단편 또는 그의 상보체.

【청구항 4】

제1항 또는 제2항의 핵산 단편 또는 그의 상보체와 혼성화하는 대립형질 특이적 올리고뉴클레오티드.

【청구항 5】

제4항에 있어서, 프로브인 것을 특징으로 하는 대립형질 특이적 올리고뉴클레오티드.

【청구항 6】

제4항에 있어서, 프라이머인 것을 특징으로 하는 대립형질 특이적 올리고뉴클레오티드.

【청구항 7】

제6항에 있어서, 상기 프라이머의 3' 말단이 상기 단편의 다형성 부위와 정렬하는 것을 특징으로 하는 핵산 단편.

【청구항 8】

서열번호 1의 1699번 다형성 부위 또는 서열번호 3의 29번 다형성 부위를 차지하는 염기를 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산의 분석방법.

【청구항 9】

제8항에 있어서, 상기 1699번 염기가 A이거나 상기 29번 염기가 T이면, MODY를 유발할 가능성이 높은 유전자로 판단하는 것을 특징으로 하는 핵산의 분석방법.

【청구항 10】

서열번호 2의 567번 아미노산 다형성 부위를 포함하고, 서열번호2의 아미노산 서열에 개시된 3개 이상의 연속적 아미노산을 포함하는 인간 HNF-1 α 폴리펩티드 변이체 또는 그 단편.

【청구항 11】

제10항에 있어서, 상기 567번 아미노산은 이소루이신인 것을 특징으로 하는 인간 HNF-1 α 폴리펩티드 변이체 또는 그 단편.

【청구항 12】

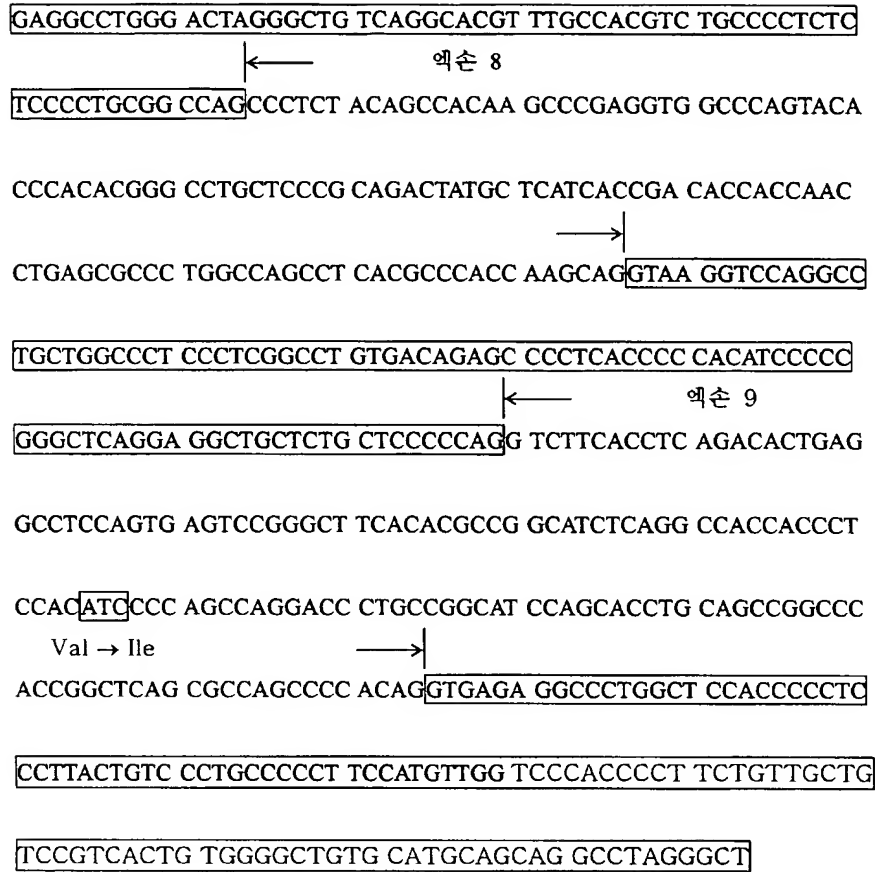
서열번호 2의 567번 아미노산 다형성 부위를 차지하는 아미노산을 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질의 분석방법.

【청구항 13】

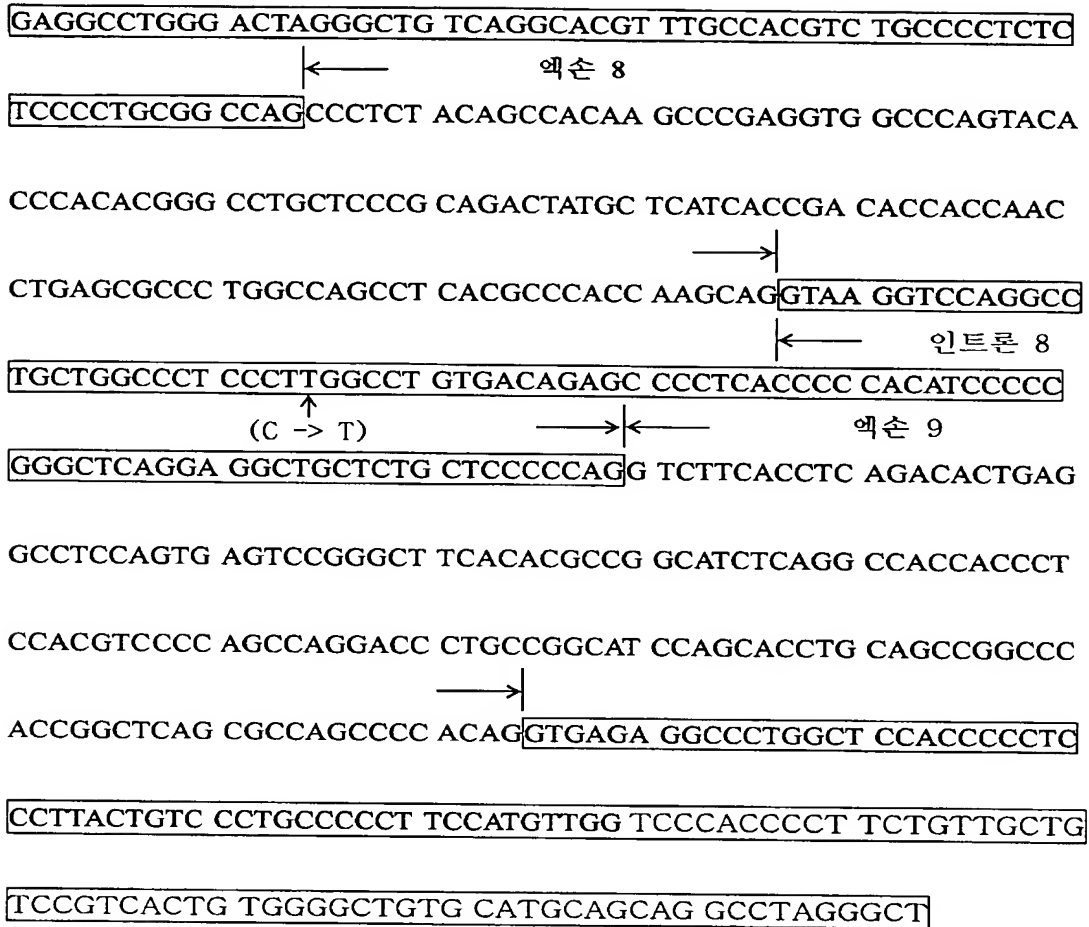
제12항에 있어서, 상기 567번 아미노산은 이소루이신이면, MODY를 유발할 가능성이 높은 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 단백질의 분석방법.

【도면】

【도 1】



【도 2】



【서열목록】

<110> Samsung Electronics Co. Ltd <120> A variant of HNF-1a gene having novel
 single nucleotide polymorphism and a variant protein encoded by the same <
 160> 23 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 1896 <212> DNA <213>
 Homo sapiens <220> <221> CDS <222> (1)..(1893) <223> amino acid sequence of
 HNF-1a <400> 1 atg gtt tct aaa ctg agc cag ctg cag acg gag ctc ctg gcg gcc ctg

48 Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu 1
 5 10 15 ctc gag tca ggg ctg agc aaa gag gca
 ctg atc cag gca ctg ggt gag 96 Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile
 Gln Ala Leu Gly Glu 20 25 30
 ccg ggg ccc tac ctc ctg gct gga gaa ggc ccc ctg gac aag ggg gag 144 Pro Gly
 Pro Tyr Leu Leu Ala Gly Glu Gly Pro Leu Asp Lys Gly Glu 35
 40 45 tcc tgc ggc ggc ggt cga ggg gag ctg gct gag ctg
 ccc aat ggg ctg 192 Ser Cys Gly Gly Gly Arg Gly Glu Leu Ala Glu Leu Pro Asn
 Gly Leu 50 55 60 ggg gag
 act cgg ggc tcc gag gac gag acg gac gac gat ggg gaa gac 240 Gly Glu Thr Arg
 Gly Ser Glu Asp Glu Thr Asp Asp Asp Gly Glu Asp 65 70
 75 80 ttc acg cca ccc atc ctc aaa gag ctg gag aac ctc agc cct gag
 gag 288 Phe Thr Pro Pro Ile Leu Lys Glu Leu Glu Asn Leu Ser Pro Glu Glu
 85 90 95 gcg gcc cac cag aaa gcc gtg gtg gag
 acc ctt ctg cag gag gac ccg 336 Ala Ala His Gln Lys Ala Val Val Glu Thr Leu
 Leu Gln Glu Asp Pro 100 105 110
 tgg cgt gtg gcg aag atg gtc aag tcc tac ctg cag cag cac aac atc 384 Trp Arg
 Val Ala Lys Met Val Lys Ser Tyr Leu Gln Gln His Asn Ile 115
 120 125 cca cag cgg gag gtg gtc gat acc act ggc ctc
 aac cag tcc cac ctg 432 Pro Gln Arg Glu Val Val Asp Thr Thr Gly Leu Asn Gln
 Ser His Leu 130 135 140 tcc


```

caa cac ctc aac aag ggc act ccc atg aag acg cag aag cgg gcc          480 Ser Gln His
Leu Asn Lys Gly Thr Pro Met Lys Thr Gln Lys Arg Ala    145          150
155          160    gcc ctg tac acc tgg tac gtc cgc aag cag cga gag gtg gcg
cag cag          528 Ala Leu Tyr Thr Trp Tyr Val Arg Lys Gln Arg Glu Val Ala Gln Gln
165          170          175    ttc acc cat gca ggg cag gga ggg
ctg att gaa gag ccc aca ggt gat          576 Phe Thr His Ala Gly Gln Gly Gly Leu Ile
Glu Glu Pro Thr Gly Asp          180          185          190
gag cta cca acc aag aag ggg cgg agg aac cgt ttc aag tgg ggc cca          624 Glu Leu
Pro Thr Lys Lys Gly Arg Arg Asn Arg Phe Lys Trp Gly Pro          195
200          205    gca tcc cag cag atc ctg ttc cag gcc tat gag
agg cag aag aac cct          672 Ala Ser Gln Gln Ile Leu Phe Gln Ala Tyr Glu Arg Gln
Lys Asn Pro          210          215          220          agc
aag gag gag cga gag acg cta gtg gag gag tgc aat agg gcg gaa          720 Ser Lys Glu
Glu Arg Glu Thr Leu Val Glu Glu Cys Asn Arg Ala Glu    225          230
235          240    tgc atc cag aga ggg gtg tcc cca tca cag gca cag ggg ctg
ggc tcc          768 Cys Ile Gln Arg Gly Val Ser Pro Ser Gln Ala Gln Gly Leu Gly Ser
245          250          255    aac ctc gtc acg gag gtg cgt gtc
tac aac tgg ttt gcc aac cgg cgc          816 Asn Leu Val Thr Glu Val Arg Val Tyr Asn
Trp Phe Ala Asn Arg Arg          260          265          270
aaa gaa gaa gcc ttc cgg cac aag ctg gcc atg gac acg tac agc ggg          864 Lys Glu
Glu Ala Phe Arg His Lys Leu Ala Met Asp Thr Tyr Ser Gly          275

```

출력 일자: 2002/11/28

30-23

Thr Asn Thr Gly Ala Ser 420 425 430
 acc ctg gtc atc ggc ctg gcc tcc acg cag gca cag agt gtg ccg gtc 1344 Thr Leu
 Val Ile Gly Leu Ala Ser Thr Gln Ala Gln Ser Val Pro Val 435
 440 445 atc aac agc atg ggc agc agc ctg acc acc ctg
 cag ccc gtc cag ttc 1392 Ile Asn Ser Met Gly Ser Ser Leu Thr Thr Leu Gln Pro
 Val Gln Phe 450 455 460 tcc
 cag ccg ctg cac ccc tcc tac cag cag ccg ctc atg cca cct gtg 1440 Ser Gln Pro
 Leu His Pro Ser Tyr Gln Gln Pro Leu Met Pro Pro Val 465 470
 475 480 cag agc cat gtg acc cag aac ccc ttc atg gcc acc atg gct
 cag ctg 1488 Gln Ser His Val Thr Gln Asn Pro Phe Met Ala Thr Met Ala Gln Leu
 485 490 495 cag agc ccc cac gcc ctc tac agc
 cac aag ccc gag gtg gcc cag tac 1536 Gln Ser Pro His Ala Leu Tyr Ser His Lys
 Pro Glu Val Ala Gln Tyr 500 505 510
 acc cac acg ggc ctg ctc ccg cag act atg ctc atc acc gac acc acc 1584 Thr His
 Thr Gly Leu Leu Pro Gln Thr Met Leu Ile Thr Asp Thr Thr 515
 520 525 aac ctg agc gcc ctg gcc agc ctc acg ccc acc
 aag cag gtc ttc acc 1632 Asn Leu Ser Ala Leu Ala Ser Leu Thr Pro Thr Lys Gln
 Val Phe Thr 530 535 540 tca
 gac act gag gcc tcc agt gag tcc ggg ctt cac acg ccg gca tct 1680 Ser Asp Thr
 Glu Ala Ser Ser Glu Ser Gly Leu His Thr Pro Ala Ser 545 550
 555 560 cag gcc acc acc ctc cac atc ccc agc cag gac cct gcc ggc

atc cag 1728 Gln Ala Thr Thr Leu His Ile Pro Ser Gln Asp Pro Ala Gly Ile Gln
 565 570 575 cac ctg cag ccg gcc cac cgg ctc
 agc gcc agc ccc aca gtg tcc tcc 1776 His Leu Gln Pro Ala His Arg Leu Ser Ala
 Ser Pro Thr Val Ser Ser 580 585 590
 agc agc ctg gtg ctg tac cag agc tca gac tcc agc aat ggc cag agc 1824 Ser Ser
 Leu Val Leu Tyr Gln Ser Ser Asp Ser Ser Asn Gly Gln Ser 595
 600 605 cac ctg ctg cca tcc aac cac agc gtc atc gag
 acc ttc atc tcc acc 1872 His Leu Leu Pro Ser Asn His Ser Val Ile Glu Thr Phe
 Ile Ser Thr 610 615 620 cag
 atg gcc tct tcc tcc cag taa 1896 Gln Met Ala
 Ser Ser Ser Gln 625 630
 <210> 2 <211> 631 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 2 Met Val Ser Lys Leu Ser
 Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu 1 5 10
 15 Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu 20
 25 30 Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Ala Gly Glu Gly Pro Leu Asp Lys Gly
 Glu 35 40 45 Ser Cys Gly Gly Gly Arg Gly
 Glu Leu Ala Glu Leu Pro Asn Gly Leu 50 55 60
 Gly Glu Thr Arg Gly Ser Glu Asp Glu Thr Asp Asp Asp Gly Glu Asp 65
 70 75 80 Phe Thr Pro Pro Ile Leu Lys Glu Leu Glu
 Asn Leu Ser Pro Glu Glu 85 90 95
 Ala Ala His Gln Lys Ala Val Val Glu Thr Leu Leu Gln Glu Asp Pro 100

```

105          110 Trp Arg Val Ala Lys Met Val Lys Ser Tyr Leu Gln Gln His Asn
Ile          115          120          125 Pro Gln Arg Glu Val Val Asp
Thr Thr Gly Leu Asn Gln Ser His Leu      130          135          140
Ser Gln His Leu Asn Lys Gly Thr Pro Met Lys Thr Gln Lys Arg Ala 145
150          155          160 Ala Leu Tyr Thr Trp Tyr Val Arg Lys Gln
Arg Glu Val Ala Gln Gln          165          170          175
Phe Thr His Ala Gly Gln Gly Gly Leu Ile Glu Glu Pro Thr Gly Asp          180
185          190 Glu Leu Pro Thr Lys Lys Gly Arg Arg Asn Arg Phe Lys Trp Gly
Pro          195          200          205 Ala Ser Gln Gln Ile Leu Phe
Gln Ala Tyr Glu Arg Gln Lys Asn Pro      210          215          220
Ser Lys Glu Glu Arg Glu Thr Leu Val Glu Glu Cys Asn Arg Ala Glu 225
230          235          240 Cys Ile Gln Arg Gly Val Ser Pro Ser Gln
Ala Gln Gly Leu Gly Ser          245          250          255
Asn Leu Val Thr Glu Val Arg Val Tyr Asn Trp Phe Ala Asn Arg Arg          260
265          270 Lys Glu Glu Ala Phe Arg His Lys Leu Ala Met Asp Thr Tyr Ser
Gly          275          280          285 Pro Pro Pro Gly Pro Gly Pro
Gly Pro Ala Leu Pro Ala His Ser Ser      290          295          300
Pro Gly Leu Pro Pro Pro Ala Leu Ser Pro Ser Lys Val His Gly Val 305
310          315          320 Arg Tyr Gly Gln Pro Ala Thr Ser Glu Thr
Ala Glu Val Pro Ser Ser          325          330          335
Ser Gly Gly Pro Leu Val Thr Val Ser Thr Pro Leu His Gln Val Ser          340

```

출력 일자: 2002/11/28

30-27

2 of MODY3 gene <400> 9 gtaaccctca ctaaagggag ggatggtgaa gcttccagcc

40 <210> 10 <211> 40 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 sense primer for amplifying exon 3 of MODY3 gene <400> 10 taatagcact cactataggg
 gcaaggtcag gggaatggac 40 <210> 11 <211> 42 <212>
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> antisense primer for amplifying
 exon 3 of MODY3 gene <400> 11 gtaaccctca ctaaaggac gccgttgtag ctattgcact cc
 42 <210> 12 <211> 43 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 sense primer for amplifying exon 4 of MODY3 gene <400> 12 taatagcact cactataggg
 ggctcatggg ttgctatttc tgc 43 <210> 13 <211> 42 <212>
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> antisense primer for amplifying
 exon 4 of MODY3 gene <400> 13 gtaaccctca ctaaaggac gtgtcccttg tccccacata cc
 42 <210> 14 <211> 42 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 sense primer for amplifying exon 5 of MODY3 gene <400> 14 taatagcact cactataggg
 tgctgaggca ggacactgct tc 42 <210> 15 <211> 42 <212>
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> antisense primer for amplifying
 exon 5 of MODY3 gene <400> 15 gtaaccctca ctaaaggat acaagcaagg acactcacca gc
 42 <210> 16 <211> 41 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 sense primer for amplifying exon 6 of MODY3 gene <400> 16 taatagcact cactataggg
 cccggacaca gcttggcttc c 41 <210> 17 <211> 42 <212>
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> antisense primer for amplifying
 exon 6 of MODY3 gene <400> 17 gtaaccctca ctaaaggaa tccccaccag cttaccgatg ac
 42 <210> 18 <211> 40 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

sense primer for amplifying exon 7 of MODY3 gene <400> 18 taatacgact cactataggg
caggcctggc ctccacgcag 40 <210> 19 <211> 40 <212>

DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> antisense primer for amplifying
exon 7 of MODY3 gene <400> 19 gtaaccctca ctaaaggag gggctctgca gctgagccat
40 <210> 20 <211> 41 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

sense primer for amplifying exon 8 and 9 of MODY3 gene <400> 20 taatacgact
cactataggg ggcccagtac acccacacgg g 41 <210> 21 <211>

40 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> antisense primer for
amplifying exon 8 and 9 of MODY3 gene <400> 21 gtaaccctca ctaaaggag ggcagggaca
gtaaggagg 40 <210> 22 <211> 41 <212> DNA <

213> Artificial Sequence <220> <223> sense primer for amplifying exon 10 of
MODY3 gene <400> 22 taatacgact cactataggg gccttggttg cctctgcagt g
41 <210> 23 <211> 41 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

antisense primer for amplifying exon 10 of MODY3 gene <400> 23 gtaaccctca
ctaaaggag gccatctggg tggagatgaa g 41